

Rec'd PCT/PTO 11 FEB 2005 #2

PCT/JP03/10117

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

08.08.03

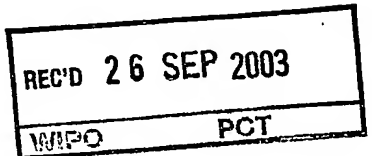
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 1月 9日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-003549  
[ST. 10/C]: [JP2003-003549]

出 願 人  
Applicant(s): グンゼ株式会社  
科学技術振興事業団

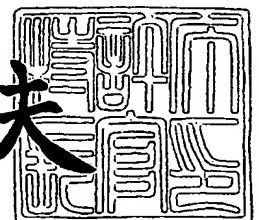


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3075114

【書類名】 特許願

【整理番号】 89402JP

【提出日】 平成15年 1月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/327

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県守山市森川原町 1 6 3 番地 グンゼ株式会社研究  
開発センター内

【氏名】 円尾 正晴

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県守山市森川原町 1 6 3 番地 グンゼ株式会社研究  
開発センター内

【氏名】 出口 哲志

【特許出願人】

【識別番号】 000001339

【氏名又は名称】 グンゼ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706768

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオセンサとその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】電極の一端に反応層（3）を有する作用電極（1）と対電極（2）とが電気絶縁基板（4）上に設けられてなるバイオセンサにおいて、該反応層が酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースと親水性セグメントと疎水性セグメントとをもって構成されている親水性ポリマとを主成分としてなることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 2】前記親水性ポリマが、直鎖オキシアルキレンセグメントとアルキル基分枝オキシアルキレンセグメントとからなる請求項 1 に記載のバイオセンサ。

【請求項 3】前記親水性ポリマ中のアルキル基分枝オキシアルキレンセグメントの平均分子量が 1 5 0 0 ～ 4 0 0 0 で、全分子中の直鎖オキシアルキレンセグメントが 3 0 ～ 8 0 重量％である請求項 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 4】前記反応層（3）が、酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースと親水性セグメントと疎水性セグメントとから構成されている親水性ポリマとの懸濁状分散水性液のコーティングによりなる請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサ。

【請求項 5】次の（A）～（C）に記載の各工程を順次行うことを特徴とする請求項 4 に記載のバイオセンサの製造方法。

（A）電気絶縁基板（4）上に、作用電極（1）と対電極（2）とを平行近接して設ける電極形成工程、

（B）予め酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースとの 3 成分を水性良溶媒に溶解した水性溶液 M a を、該 3 成分に対しては貧溶媒であるが前記親水性ポリマに対しては良溶媒である水性溶媒に溶解した該親水性ポリマ溶液 P a 中に攪拌しながら滴下して懸濁状分散水性液を調製する反応層（3）用塗布液の調製工程、

（C）前記（A）工程で得られた電極形成板の電極の一端に、前記（B）工程で調製された反応層（3）用塗布液を塗布・乾燥して反応層（3）を形成する反応

層形成工程。

**【発明の詳細な説明】**

**【0 0 0 1】**

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、保存安定性（経時変化しない）等に関し、より高いレベルに改良されたバイオセンサとその製造方法の提供にある。

**【0 0 0 2】**

**【従来の技術】**

従来のバイオセンサの欠点を改良する技術については、多くの特許文献で知ることができるが、その中で特に反応層に関し、酵素と電子メデエータを反応層とする系に微細結晶セルロースを共存させる技術がある（特許文献 1 参照。）。

この特許文献 1 の技術に対して、更なるより改良（個々のバイオセンサ間のバラツキ、測定感度、保存安定性等）を計った技術として、既に本発明者等によって特許出願もなされた（特許文献 2 参照。）。

**【0 0 0 3】**

**【特許文献 1】**

特開 2 0 0 1 - 3 1 1 7 1 2 号公報

**【特許文献 2】**

特願 2 0 0 2 - 2 3 5 6 9 7 号

**【0 0 0 4】**

**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、特許文献 2 の技術に対して、特に保存安定性の更なる改善と共に、より高い精度で測定できるバイオセンサを見出す事を主たる課題として鋭意検討したものである。その課題解決手段は次のものである。

**【0 0 0 5】**

**【課題を解決するための手段】**

まず本発明は、請求項 1 を主発明とするバイオセンサであり、それは電極の一端に反応層（3）を有する、作用電極（1）と対電極（2）とが電気絶縁基板（4）上に設けられてなるバイオセンサにおいて、該反応層が酸化還元酵素と電子

受容体と微細結晶セルロースと親水性セグメントと疎水性セグメントとをもって構成されている親水性ポリマとを主成分としてなることを特徴とするものである。

#### 【0006】

そして前記親水性ポリマに関し、好ましい発明として請求項2～4が提供される。

#### 【0007】

又、前記特に請求項4におけるバイオセンサの製造手段に関して、請求項5が提供される。つまりそれは次の(A)～(C)に記載の各工程を順次行うことを特徴とするものである。

(A) 電気絶縁基板(4)上に作用電極(1)と対電極(2)とを平行近接して設ける電極形成工程、

(B) 予め酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースとの3成分を水性良溶媒に溶解した水性溶液Maを、該3成分に対しては貧溶媒であるが前記親水性ポリマに対しては良溶媒である水性溶媒に溶解した該親水性ポリマ溶液Pa中に攪拌しながら滴下して懸濁状分散水性液を調製する反応層(3)用塗布液の調製工程、

(C) 前記(A)工程で得られた電極形成板の電極の一端に、前記反応層(3)用塗布液を塗布・乾燥して反応層(3)を形成する反応層形成工程。

以下本発明を次の実施形態で詳述することにする。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

まず、本発明のハード部位を構成する信号変換部位の電極から説明する。

該電極は、作用極(1)(測定極とも呼ぶ。)と対電極(2)(必要によっては参照極も)とが1対となって平行近接して、電気絶縁基板(4)上に設けられているが、該基板としては、例えば厚さ約50～200 $\mu$ mのポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリエチレンナフタレート、脂肪族ユニットと芳香族ユニットとからなる生分解性ポリエステル樹脂等のポリエステル系樹脂フィルム、より耐熱性、耐薬品性、強度等に優れるポリアミドイミドフィルム、ポリイミド

フィルム等のプラスチックフィルム、セラミック等の無機系基板が挙げられる。

一般には、該プラスチックフィルムであるが、製造の容易さ、耐熱性、耐薬品性、強度等の特性を合わせ持つという意味から、ポリエステル系樹脂フィルムに該ポリイミドフィルムをラミネートした2層基板とする場合もある。

尚、ポリエステル系樹脂フィルムの場合に酸化チタン等を練り込み白色基板とするのが見易さ等の点で好ましい。

#### 【0009】

作用電極（1）と対電極（2）とは、前記基板（4）上に、（直接又は間接的に）例えば白金、金、パラジウム、インジウムスズ酸化物等の良電導体によって形成される。形成手段は、ホットスタンピングによっても作れるが、真空蒸着又はスパッタリングによる方が微細な電極パターンを精度良く、迅速に形成できるので好ましい。このスパッタリングの場合は、該両極形成外をマスクングすることで一挙に形成できる。

勿論まず該良電導体による全面薄膜形成してから、これをフォトリソ法によって、相当する電極パターンにすることでも形成できる。

#### 【0010】

前記電極の厚さは、前記良電導体の有する固有抵抗により異なるが、必要以上に厚くならないようにする。一般には約30～150nmで良い。

形状は、基本的にはストライプ状で、これを前記基板上に平行近接配置とする。そして反応層（3）が設けられる該電極先端の形状は、一般にはストライプ状そのままであるが、該反応層との接触面積をより大きくするように、例えば曲折形状にしても良い。

尚、該電極のもう一端は、測定装置に内蔵される電位走査部に連結される端子となり、一般に着脱自在機構をもっている。

#### 【0011】

又、前記反応層（3）を設ける電極部分は、（該反応層を形成する4成分混合液が他部分に漏れるようなことのないように）該反応層用部屋（セル）と（検体が毛細管作用によって容易に取り込まれるように）細い吸入口とが形成される構造にするのが良い。この構造は、例えば該部屋用の窓と該吸入口用の切り込みを

設けた所定厚さの前記フィルムを介して上面全体を電気絶縁性の前記フィルムで蓋をする事で形成される。

#### 【0012】

参考までに、以上の信号変換部位の構造を概略的に図1の斜視図でもって図解しておく。

該図で4が電気絶縁基板、その上に平行に近接して設けられたストライプ状の作用電極1と対電極2、該両電極の上面に、端子1a、2aを残して電気絶縁性スペーサ5が積層されている。該スペーサには、その先端（Rカーブ）から反応層（3）に通じる吸入路（口）用の切り込みと該反応層用の窓7が設けられている。そして最終的にはその上に電気絶縁性シートが外面カバー6として積層され保護される。これにより該反応層に通じる検体吸入（通路）口8が形成される。検体吸入量と吸入のし易さは該吸入口の形状、断面積等によって左右される。そして該反応層の容積は、該スペーサの厚さと該窓の面積によって決まる。各々、適宜変えて最適条件を決めると良い。

#### 【0013】

次に反応層（3）について説明する。

該反応層は、前記の通り、酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースと親水性セグメントと疎水性セグメントとにより構成されている親水性ポリマとの4成分を主成分として形成される層である。

以下個々の成分から説明する。

#### 【0014】

まず酸化還元酵素は、検体と接しその中のある検査成分と選択的に酸化還元的に反応し、そしてそれを認識する中枢成分である。従って少なくともこの酸化還元酵素はなくてはならないものである。ここで該酵素と選択的に酸化還元反応する成分は、例えばグルコース成分、アルコール成分、乳酸成分、尿酸成分である。勿論、これ等の成分の全てが一種の酵素によって行われるのではなく、これ等成分と選択的に反応する各種酵素が使用される。

尚、例えばグルコースはグルコースオキシターゼ酵素と選択的に反応するが、実際の反応は水と酸素の共存のもとで行われ、グルコン酸と過酸化水素が生成す



る。

#### 【0015】

しかしながら、一般には前記酵素のみでは、認識応答が遅く、測定精度も良くないので、これを補うために、電子受容体（電子メディエータとも呼ぶ。）の共存が行われてる。この電子受容体を共存させる使い方の代表例がグルコースセンサであり、例えば血液を検体とする血糖値の測定である。

該電子受容体は、一般には酵素の酸化還元反応に伴って、還元酸化を促進させる無機又は有機の微細粉末状化合物である。

具体的には、例えば、フェリシアン化アルカリ金属塩（カリウム金属塩が良い）、フェロセン又はそのアルキル置換体、p-ベンゾキノン、メチレンブルー、 $\beta$ -ナフトキノン4-スルホン酸カリウム、フェナジンメトサルフェート、2、6-ジクロロフェノールインドフェノール等が挙げられる。就中、フェリシアン化アルカリ金属塩、フェロセン系が有効に作用する。これは、電子移動媒体としての働きが安定していること、水、アルコール類、又はこれら混合溶媒等の水性溶媒に良く溶け、後述の微細結晶セルロースとの相溶性も良いことによる。

尚、この電子受容体粉のサイズは、約5～100  $\mu\text{m}$ である。

#### 【0016】

前記2成分により実用レベルの反応層は得られるが、しかしながら両成分混合調製（一般に水溶液にして、これを前記電極面に塗布する）の条件とか、得られたバイオセンサの使用環境等によって、測定精度にバラツキが出やすい。つまり常に一定性能を有するバイオセンサが得がたい。この原因は良く判らないが、塗布後に析出形成される結晶構造にもよることが考えられる。

#### 【0017】

そして、第3成分としての微細結晶セルロースは、前記の測定精度のバラツキを改善する成分として添加される。このバラツキの改善の因子は種々考えられる。例えば、該セルロースが空気中の水分を速やかに吸収するとか、電子受容体の電極への直接接触のチャンスが少なくなるとかの要因で電極と電子受容体間での電気化学的反応を抑制されることとか、酵素粒子と電子受容体粒子とをより微細に均一に分散させることとか、また例えば血液を検体とする場合に血漿中に微量

の血球が混入されていてもこれを該セルロースが吸着してくれることとか、該セルロースがネットワークを形成することで前記2成分の系外への飛散が防止されるとかであり、これ等の作用因子が相乗的に働き、その結果バラツキの軽減に繋がるのではないかと考えられる。

#### 【0018】

ここで微細結晶セルロースは、植物繊維中の結晶部分を抽出して得た微細粒で、その大きさは一般に直径約10  $\mu$ m以下、長さ300  $\mu$ m以下である。勿論この微細結晶セルロースが主体になるが、これに同時的に取得できる非晶セルロース微粉末が混入されていても良い。

#### 【0019】

前記3成分による反応層で、バラツキも大きく改善され、高い精度でもって測定することができるが、しかし実際に使用する段階に至っては、更なる種々の事前チェックが行われる。その中で次のような点では、更なる改良点があることが判り、完全実用には不十分である。

それは特に製造からユーザが実用するまでの期間が長い場合、測定値に低下傾向が見られ、正確な測定ができない。つまり反応性に経時変化が見られることで長期間の保存安定性に欠ける点である。

又、検体中に有する成分量（絶対値）と実測値との差を更に近づけ、測定精度をより高めるということに対しても十分に満足できていない点もある。

#### 【0020】

前記のような、なお不十分な点を改良するために見出された成分が、前記の親水性セグメントと疎水性セグメントとをもって構成されている親水性ポリマである。従って、該ポリマは、前記3成分との組合せでのみ大きな作用効果をもたらすものであり、該3成分中の例えば微細結晶セルロースが欠けても、他の成分に置換されても、本発明でいう課題は解決されるものではない。

前記3成分の中に、更に該ポリマの混在が有効である理由は明確ではないが、次のような作用効果によることが推察される。

つまりこの4成分により、前記3成分による反応層よりもより均一に極微細粒でもってそれが混晶的に形成され、しかも該ポリマが3成分を相互に緻密に繋い

だ状態でもって反応層（３）が形成される。このことが、以後の該反応層内部の状態を不変なものとし、外部環境（特に乾燥環境）に対しての影響もより小さくなり、そのことが経時変化しないものになっている。

そして、より微細にして成分相互が緻密に繋がれている事で、検体成分との反応結果が電極に、より定量的に、迅速に取り込まれても行く。つまり高い測定精度へと繋がって行くという結果になっている。

#### 【0021】

前記親水性ポリマとしては、例えば次の内容のポリマである。

まず親水性という意味は、水又は水に溶解する少なくとも水酸基結合の脂肪族アルコール又はこれ等の混合溶媒に対して、溶解又は水和して膨潤する性質をいう。

#### 【0022】

具体的には、例えばポリアクリル酸系のアルカリ金属塩又はポリアクリル酸系のアルカノールアミン塩とか、ポリオキシアルキレン系等が挙げられる。就中ポリオキシアルキレン系が好ましい。このものとしては、例えば高級脂肪族基（疎水性）を一末端に有するポリオキシエチレンアルキル（親水性）エーテル、ポリエチレングリコール（親水性）の高級脂肪酸エステル（疎水性）、直鎖オキシアルキレンセグメント（親水性）とアルキル基分枝オキシアルキレンセグメント（疎水性）とからなるポリマ等が挙げられるが、就中後者の直鎖オキシアルキレンセグメントとアルキル基分枝オキシアルキレンセグメントとからなる親水性ポリマ（以下これをAポリマと呼ぶ。）がより好ましい。これは、前記の親水性ポリマ混在の作用効果をより一層大きなものとする以外に、より明確な両性を有することで、例えば請求項５に記載するバイオセンサの製造、特に（Ｂ）の反応層用塗布液の調製工程を有効に行い、前記の作用をより一層効果的なものにすることができると、前記電極基板との間が親和的になり、コーティングもし易く、密着もより良化する等の理由にもよる。

従って全くの親水性セグメントのみでも、疎水性セグメントのみでも、高いレベルでの前記の長期間保存安定性等の効果は得がたい。

#### 【0023】

前記Aポリマにおいて、親水性を発現する直鎖オキシアルキレンセグメントと疎水性を発現するアルキル基分枝オキシアルキレンセグメントの結合は、例えばランダムか、交互に規則的に結合（ブロック構造）しているかであるが、ここでは後者のブロック構造であるのがより好ましい。これは該ユニット間の分子量のコントロールが容易で、それによる親水性と疎水性の程度もはっきりと容易に変えることができるからである。

この両性のバランスは、分子量と含有量とで制御することもでき、本発明では、請求項3で提供するように規制するのが良い。

つまり、この親水性ポリマ中のアルキル基分枝オキシアルキレンセグメントを平均分子量でいい、直鎖オキシアルキレンセグメントを重量%でいう。具体的には、前者は好ましくは1500～4000、より好ましくは2000～3000、後者は好ましくは30～80重量%、より好ましくは40～70重量%ある。

尚、かかる親水性ポリマであると、形成される反応層（3）の表面も、ベトツキ感ない状態で形成されると共に、乾燥環境に置かれても、その反応層が異常に乾燥した状態に変化し、その結果反応層の作用に悪影響をもたらすといった危険性もなくなる。つまりより優れた保存安定性能が付与されるというものである。

#### 【0024】

尚、前記直鎖オキシアルキレンセグメントを形成するモノマ成分は、例えばエチレンオキサイド、1、3-プロピレンオキサイド、1，4-ブチレンオキサイド等の直鎖アルキレンオキサイドの開環重合ポリマユニットであり、そして疎水性を発現するアルキル基分枝オキシアルキレンセグメントを形成するモノマ成分は、メチルエチレンオキサイド、エチルエチレンオキサイド等のアルキル基が分枝（側鎖）しているアルキレンオキサイドの開環重合ポリマユニットである。

#### 【0025】

基本的には前記4成分を主として組成すれば良いが、その場合、各々の組成割合を次のようにするのがより有効である。

つまり、酸化還元酵素0.1～10重量%、好ましくは0.3～6重量%、電子受容体20～90重量%、好ましくは35～86重量%、微細結晶セルロース1～30重量%、好ましくは3～20重量%、親水性ポリマ2～40重量%、好

ましくは5～30重量%である。

#### 【0026】

本発明のバイオセンサは、前記4成分を主成分とする反応層(3)の形成によって、これ等成分が相乗的に作用しあって初めて前記の大きな改善効果に繋がることになるが、これも如何なる製造手段を採っても全く同じレベルで得られるとは限らない。一定性能を有する該バイオセンサがより有効に製造できる方法が、請求項5で提供される製造方法である。

以下製造方法については、該請求項5を主にして説明することにする。

#### 【0027】

請求項5で提供する製造方法は、各種考えられる方法の中で、特に請求項4で提供する、反応層(3)を形成するためにコーティングする塗液が、懸濁状分散水性液の状態にある場合の製造方法である。この4成分が完全に溶解し、(透明)水性液となったものをコーティングするよりも、より一層大きな効果となって得られるからである。

#### 【0028】

まず、(A)の電極形成工程から説明する。

本工程は、電気絶縁基板(4)上に作用電極(1)と対電極(2)とを平行近接して設けることであるが、該基板として好ましいのは、前記例示する中で、ポリエステル系樹脂フィルムにポリイミドフィルムをラミネートした2層基板で行うことである。そこでこの場合について説明することにする。

#### 【0029】

(本来それ自身基体として使用する)ポリエステル系樹脂フィルムの厚さとしては、一般に70～150 $\mu$ m程度のPETフィルムであり、これに積層するポリイミドフィルムとしては、一般に厚さ20～50 $\mu$ m程度の(薄い)芳香族ポリイミドフィルム(以下PIフィルム)を使う。

予めPIフィルムに前記両電極を形成しておき、これを接着材を介して該PETフィルムにラミネートする。これにより一挙に2層基板と共に、電極の形成も終了する。そして耐熱、耐薬品性、各種物性に卓越した電極板にもなるというものである。

尚、予め P I フィルムに該電極を形成しておき、これを P E T フィルムにラミネートする理由は次による。

好ましく採用するスパッタリング法による電極形成において、P I フィルムは、強靱で高耐熱性があり、より薄い該フィルムを大量にロール巻きで使用する事ができ、且つ形成される電極の密着性にも優れていることによる。つまりより長尺の該フィルムがロール対ロールでより長時間連続供給でき、生産性の高い、高品質の電極板が得られ易いとの理由からである。

#### 【0030】

前記スパッタリング法で使用する良電導体としては、高純度の白金が好ましく使用されるが、この場合のスパッタリング条件は、アルゴン雰囲気下、真空度  $1.3 \sim 1.3 \times 10^{-2}$  Pa、投入電力  $0.2 \sim 3$  kW、スパッタリング速度  $0.2 \sim 3.0$  m/分である。そしてマスキングによる電極形成は次のようにして行う。

例えば、所望する両電極形状がストライプ状である場合は、まずマスキング材として2本のストライプ状の平行穴が打ち抜かれたマスク用板を使い、これを連続供給される P I フィルムの上面に隙間なく接する状態で固設しておく。前記の速度で該フィルムの供給と同時的にスパッタリングをスタートする。抜いたストライプ状の窓穴から、スパッタリング白金が投射されて、連続した2本のストライプ状電極が密着形成される。ロール対ロールで供給され巻き取られる。

尚、一回のスパッタリングでは所定厚さの電極が得られない場合は、巻き戻しつつ更にスパッタリングを繰り返す。

#### 【0031】

前記電極の形成された P I フィルムは、P E T フィルムに接着材を介してラミネートする。そして、図1で説明する反応層(3)の部屋と検体吸入口とが形成されるように切り抜き加工されたスペーサ5と外面カバー6とを順次接着材を介して接着積層する。勿論、この外面カバー6は、(C)工程を経た後に、端子1a、2a部分は残して被覆される。

#### 【0032】

前記(A)工程が終了したら、(B)工程の反応層(3)用塗布液の調製が行われる。

該工程は、まず前記の酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースとの3成分を前記組成比以内で水性良溶媒中に添加されて、実質完全溶解した（従って透明状態）水性溶液M aが調製される。

ここで該水性良溶媒とは、該3成分が水系液に実質完全溶解する溶媒をいうが、具体的には水又は水と略自由に溶解する低級1価脂肪族アルコール（せいぜいC<sub>3</sub>迄）との混合液が例示できる。

溶解手順としては、該3成分を該溶媒に、同時的に添加し攪拌しながら常温で溶解しても良いが、まず微細結晶セルロースを水（蒸留水）に溶解しておき（約4～7重量%程度の低濃度としホモジナイザーを使って溶解するのが良い）、この中に残り2成分を添加し溶解するという逐次的方法の方が、効率良く完全溶解できるので良い。

#### 【0033】

一方、別途前記親水性ポリマの溶液P aが調製される。これに使う溶媒も水性溶媒であるが、ここでの水性溶媒の意味は、該ポリマ自身は水又は水を含む前記低級1価脂肪族アルコール自身に対しては、親水性で略完全に溶解もする該溶媒である。しかしながら、前記3成分に対しては、難溶ないし実質的に不溶性である溶媒という意味である。

前記3成分に対して難溶ないし実質的に不溶性な水性溶媒としては、例えばC<sub>4</sub>以上の1価脂肪族アルコール、2～3価の高級脂肪族多価アルコール又は該多価アルコールの水酸基の少なくとも1個がアルキル基置換された多価アルコールが挙げられる。この中でも、1個の水酸基をアルキル基置換した2価の脂肪族アルコールが好ましく、具体的には例えばエチレングリコールのモノメチル又はモノエチルエーテルである。勿論溶解性をコントロールする意味で、これ等有機溶媒の中で2種以上を混合して調整することもできる。

#### 【0034】

そして前記3成分溶解の水性溶液M aが、前記親水性ポリマ溶液P a中に攪拌の下で滴下される。この攪拌も余り激しくするのではなく、静かに行い、そして滴下も、一定量を一定時間要して、ゆっくりと滴下するようにするのが良い。このような特別な混合手段は、特に懸濁状分散水性液として調製するのに有効であ

る。

ここで該水性溶液M aの中に予め親水性ポリマも混合溶解させておいて、親水性ポリマ溶液P aには、親水性ポリマが含まない状態で滴下混合しても良いし、該水性溶液M aの中に親水性ポリマ溶液P aを滴下混合するという手順を採っても良いが、前記(B)工程の手順の方がより期待効果の高い反応層(3)を形成することができる。

#### 【0035】

前記懸濁状分散水性液は、完全溶解水性液にすることもできる。これを反応層(3)用の塗布液として使用した場合、前記3成分のみからなる水性液を反応層(3)に使用した場合よりも保存安定性は良い。しかしながら、より長期間での保存安定性とか、より短い時間で測定できる等の効果は得られ難い。この点をより有効に発現するのが、わざわざ懸濁状分散水性液にして、これを反応層(3)用の塗布液とすることである。この理由は、次のように考えられる。

本来前記3成分は結晶性の微粉体であることから、この塗布液が完全溶解液であっても、塗布後乾燥して膜を形成した時点では、各々元の結晶粒子になって混合分散している。しかしここでの各粒子は、大小様々で不均一で混合分散されている。これが相互間の繋がりを悪くもし、測定の経時変化に繋がることになっている。

しかしながら、この塗布液は、水性溶媒を伴って親水性ポリマ中で析出した状態で分散している、つまり懸濁状水性液の状態にある。しかも、この懸濁状態が、同じような粒径で、且つ超微細粒でもってなっている。このような塗布液が塗布・乾燥されて反応層(3)として形成されると、この粒子分散状態は変化することなく親水性ポリマ中で分散している。このよう状態で形成される該反応層では、検体との反応も迅速で、且つ環境等にも影響されることなく長期間安定を保ち続ける。

#### 【0036】

そして前記(B)工程で調製された反応層(3)用塗布液は、次の(C)の反応層形成工程に移される。ここでは前記(A)工程で得られた電極形成板の電極の一端(図1では7の窓の部分)に、該塗布液の所定量を滴下して塗布し、乾燥



して膜が形成される。この膜は作用電極 1 と対電極 2 にまたがって固着され、反応層 (3) として機能する。

以上の (A) ~ (C) の工程を経て所望するバイオセンサが得られるが、最後には、バイオセンサチップとしてカット加工して全工程が終了する。

尚、該反応層は、作用電極 1 を中枢に対電極 2 とに渡設されるのが良いが、対電極 2 は必ずしも同等に設けられていなくてもよい。

#### 【0037】

##### 【実施例】

以下比較例と共に実施例によって更に詳述する。

尚、ここでの実施例は、本バイオセンサの製造方法の好ましい形態として提供する、請求項 5 の記載に従って具体的に説明することにする。

#### 【0038】

##### (実施例 1)

まず A の電極形成工程は、次の内容で実施した。

次のような仕様で、図 1 に示す構造の 100 個の酵素センサを作製した。

つまり厚さ  $25\mu\text{m}$  のポリイミドフィルム上に、厚さ  $0.06\mu\text{m}$ 、大きさ  $1\times 35\text{mm}$ 、間隔  $1\text{mm}$  で、作用極 1 と対極 2 とを白金のスパッタリングにより形成し、これを厚さ  $250\mu\text{m}$  の白色 PET フィルム (4) に接着剤でラミネートして積層した。次に、この両電極形成面に一端は端子 (1a、2a) として残し、もう一端は両極にまたがる大きさの長方形の窓 7 ( $1.5\times 5\text{mm}$ ) (反応層 3 となる部屋) 及びこの窓に通じる検体吸入路用の切り込み (検体吸入口 8) を設けた、厚さ  $100\mu\text{m}$  の PET フィルム (電気絶縁スペーサ 5) を接着剤を介して積層した。

#### 【0039】

一方 (B) の反応層 (3) 用塗布液の調製工程は、次の内容で実施した。

まず使用した 4 主成分は次のものであった。

- 酸化還元酵素・・グルコースオキシターゼ (東洋紡績株式会社製 活性  $165\text{ ユニット (u) /mg}$ )  $2.44\text{ g}$  (以下実験酵素と呼ぶ。)
- 電子受容体・・純フェリシアン化カリウム (株式会社ナカライテスク製)  $40$

g (以下実験電受体と呼ぶ。)

●微細結晶セルロース溶液・セオラスクリーム (旭化成工業株式会社製 F P-03 で結晶セルロース 10 重量%水溶液) 100 g を 150 ml の蒸留水に均一溶解した水溶液 (以下実験セルロース液と呼ぶ。)

●親水性ポリマ溶液・酸化エチレンと酸化プロピレンによるブロックポリマで、オキシプロピレングリコールユニットの平均分子量約 2050、全分子中の酸化エチレン含量約 50 重量%よりなり、外観 (20℃) はペースト状。該ポリマの 7.5 g を 100 ml のエチレングリコールモノエチルエーテルに均一溶解したもの (以下実験親水性ポリマ溶液 P a と呼ぶ。)

#### 【0040】

そして前記の実験酵素と実験電受体とを実験セルロース液に添加し完全に溶解した。この 3 成分水溶液を水性液 M a と呼ぶ。

#### 【0041】

次に攪拌状態にある前記実験親水性ポリマ溶液 P a 中に、水性液 M a を静かに滴下し、全量滴下終了したらそのまま 5 分間攪拌を続けて停止した。全体は微粒子の析出で懸濁状の水性液に変化した。以下これを反応層 (3) 用塗布液とする。

#### 【0042】

最後に (C) の反応層形成工程に移り、反応層 (3) を形成し、所望する 100 個のバイオセンサに仕上げた。

つまり前記 (A) 工程で得た白金電極形成板に設けた長方形の窓 7 にピペットで 1  $\mu$  L をゆっくりと滴下し乾燥して反応層膜 (該膜面はベトツキはない) を固着した。最後にこの上を P E T フィルムで前記端子 1 a、2 a を残して、接着剤 (反応層と検体吸入路に相当する部分には使用せず) で貼着積層 (外面カバー 6) しチップ状にカットして所望する 100 個の酵素センサチップを得た。

#### 【0043】

(比較例 1)

実施例 1 において、親水性ポリマを使用しない以外は全く同一条件で実施した。つまり、まず比較用の反応層 (3) 用塗布液 (外観上は実施例 1 と同じ状態の

水性液)を調製し、これを白金電極形成板の窓7に塗布して反応層膜となし、100個の比較用の酵素センサチップを得た。

#### 【0044】

##### (実施例2)

実施例1、比較例1で得た各酵素センサチップ20個(ランダム抜取り)を用いて、その両端子1a、2aを酵素センサ測定器に連結して、次の条件で各走査電位に対する電流を測定した。

まず検体として濃度100mg/dLのグルコース水溶液を使用した。各酵素センサチップは、5日間保存した10個と40日間保存した10個を使用した。そして各10個の該チップの吸入口から該検体5 $\mu$ Lを注入し8秒経過したら、直ちに走査速度50mV/sで0V $\rightarrow$ -0.2V $\rightarrow$ +0.2Vの経緯で電位を連続的に変えながら印加し、その時発生する電流を測定した。各々の場合の印加電位に対する電流に基づく出力感度を求めた。各10個の該感度を平均して求め表1に示した。

尚該出力感度は、印加電位-0.2V $\rightarrow$ +0.2V間での電流値の積分値(積算電流値)である。この数値は、反応層での検体の反応変位が迅速に確実に電極へ取り込まれる効率を知る指標となり、従って大きい程反応変位の全てが取り込まれたことになる。一般に検体成分と反応層との反応性もさることながら、可能なかぎり反応変位の全てが電極に取り込まれることも、測定精度上から極めて重要になる。

#### 【0045】

【表1】

	5日	40日
実施例1	128	127
比較例1	92	81

#### 【0046】

次に残る前記酵素センサチップの中から35個を抜き取り(ランダム)、前記検体を使い、次の条件で測定し、各経過日に対する発生出力を測定し、出力変化

率 (%) を求めてそれを図 2 のグラフで示した。

まず、35 個の該センサチップを乾燥剤入りの常温の保存容器中に、1 日～60 日の間放置した。この容器の中から各経過日毎に 5 個ずつ取出して、その各 5 個に該検体の 5  $\mu$ L を注入し、前記実施例 1 と同じ測定条件で発生出力を測定した。そして 1 日経過した該センサチップの発生出力 (5 個の出力平均) を以後の各経過日の該出力 (5 個の発生出力値の平均値) で除し、これに 100 を乗じて出力変化率 (%) とした。

該図で実 1 が実施例 1、比 1 が比較例 1 であり、小さい程安定していることになる。

尚、比較例 1 については、実施例 1 との間で顕著な差が現れたので 36 日迄とした。

#### 【0047】

又、前記各経過日で測定した前記センサチップ 5 個の出力のバラツキから CV 値 (%) を求め、各経過日に対する CV 値も図 2 のグラフに示した。該図で実 c v が実施例 1 に、比 c v が比較例 1 に対応している。

尚 CV 値は、各経過日で測定した 5 個のセンサチップのバラツキから標準偏差値を求め、これを平均値電流で除した値に 100 を乗じたものである。

以上の実験結果からも証明されるように実施例 1 は、比較例 1 に比べてより製品間バラツキも小さく、長期間の保存安定性に優れていることが判る。

#### 【0048】

##### 【発明の効果】

本発明は、前記の通り構成されているので次のような効果を奏する。

#### 【0049】

バイオセンサの保存がより長期間に及んでも、殆ど検体成分との反応性に変化がなく、より高い精度で測定できるようにもなったので、これにより生産管理、在庫管理もしやすく、またユーザでの取扱も容易になった。

#### 【0050】、

検体との反応による結果がより確実に、効率良く測定できるのでより精度の高いバイオセンサが製造できるようになった。

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

本発明のバイオセンサの信号変換部位の構成例を斜視図で示す。

**【図 2】**

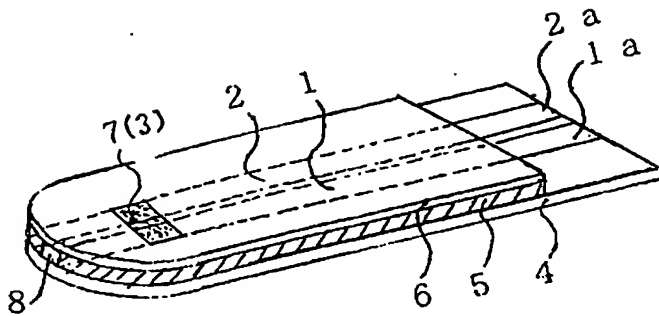
酵素センサの経過日に対する出力変化率と C V 値とをグラフで示す。

**【符号の説明】**

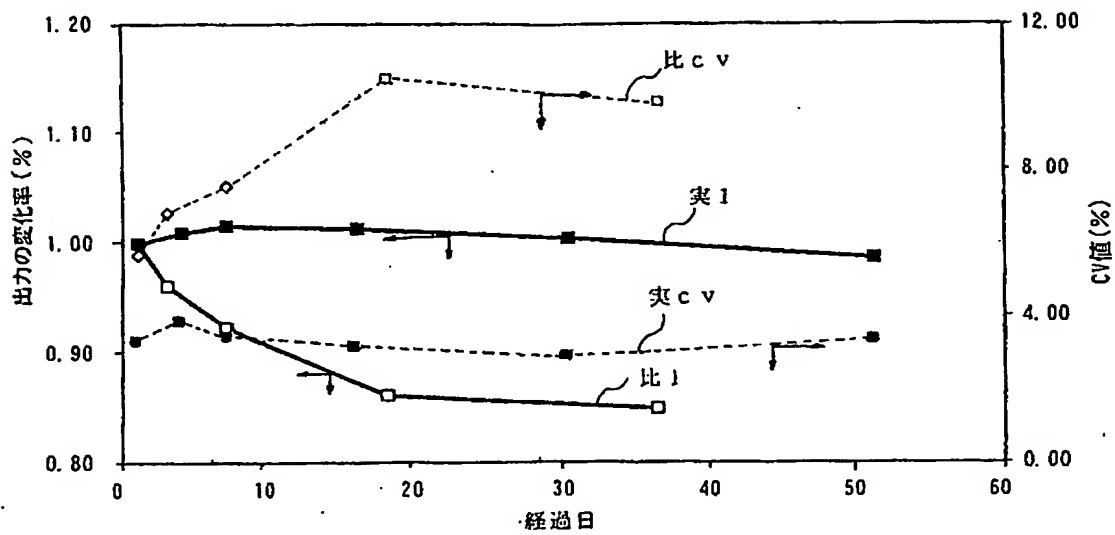
- 1 ・ 作用電極
- 2 ・ 対電極
- 4 ・ 電気絶縁基板
- 5 ・ 電気絶縁スペーサ
- 6 ・ 外面カバー
- 7 ・ 反応層（3）用窓
- 8 ・ 検体吸入口

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 保存安定性等のより改良されたバイオセンサの提供。

【解決手段】 電極の一端に反応層（３）を有する作用電極（１）と対電極（２）とが電気絶縁基板（４）上に設けられてなるバイオセンサにおいて、該反応層が酸化還元酵素と電子受容体と微細結晶セルロースと親水性セグメントと疎水性セグメントとをもって構成されている親水性ポリマとを主成分としてなることを特徴とするバイオセンサ。該４成分の電極への塗布に際しては、この４成分を懸濁状分散水性液状態で行うのがより望ましい。バイオセンサ中酵素センサに有効。

【選択図】 図１

特願 2 0 0 3 - 0 0 3 5 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 3 3 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府綾部市青野町膳所 1 番地

氏 名

ゲンゼ株式会社



特願 2003-003549

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**